

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 10 月 21 日 (21.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/089109 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A23K 1/16, 1/18, 1/08  
 (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005089  
 (22) 国際出願日: 2004 年 4 月 8 日 (08.04.2004)  
 (25) 国際出願の言語: 日本語  
 (26) 国際公開の言語: 日本語  
 (30) 優先権データ:  
 特願2003-104551 2003 年 4 月 8 日 (08.04.2003) JP  
 (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 明治飼糧株式会社(MEIJIFEED CO., LTD.) [JP/JP]; 〒130-0021 東京都墨田区緑1丁目26-11 Tokyo (JP).  
 (72) 発明者; および  
 (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 羽川 義人 (HAGAWA, Yoshihito) [JP/JP]; 〒134-0015 東京都江戸川区西瑞江4-13-108 Tokyo (JP). 香川 保憲 (KAGAWA, Yasunori) [JP/JP]; 〒361-0042 埼

玉県 行田市 西新町 1-48 Saitama (JP). 酒井 清高 (SAKAI, Kiyotaka) [JP/JP]; 〒309-1075 茨城県西茨城郡友部町東平3-3-5 Ibaraki (JP). 折橋 毅典 (ORIHASHI, Takenori) [JP/JP]; 〒272-0814 千葉県市川市高石神16-3 Chiba (JP). 岸村 之雅 (KISHIMURA, Yukimasa) [JP/JP]; 〒189-0025 東京都東村山市廻田町2-29-39 Tokyo (JP). 神辺 道雄 (KANBE, Michio) [JP/JP]; 〒189-0003 東京都東村山市久米川町5-8-9 Tokyo (JP).

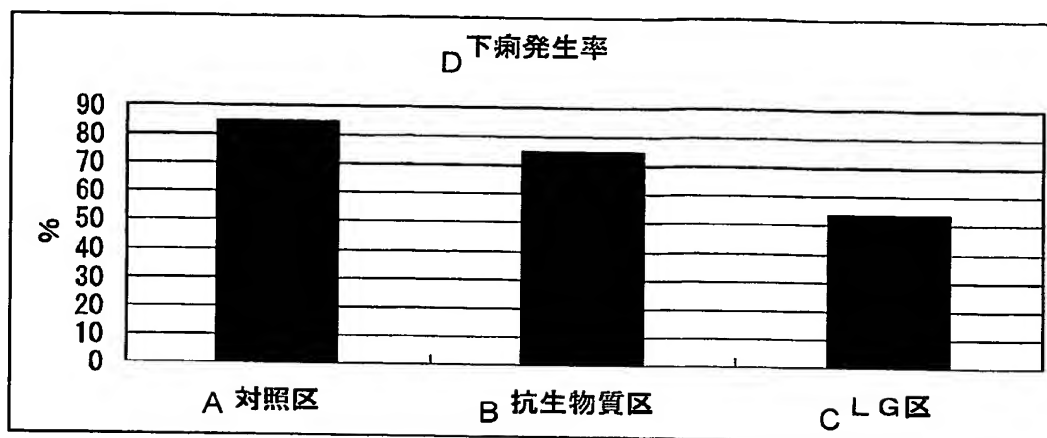
(74) 代理人: 小栗 昌平, 外(OGURI, Shohei et al.); 〒107-6013 東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク森ビル13階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,

[続葉有]

(54) Title: FEED COMPOSITION

(54) 発明の名称: 飼料組成物



A...CONTROL SECTION

B...ANTIBIOTIC SECTION

C...LG SECTION

D...DIARRHEA OCCURRENCE %

(57) Abstract: A feed auxiliary comprising at least one matter of lactic acid bacteria belonging to *Lactobacillus gasseri*, a pulverization product of the lactic acid bacteria, a culture product of the lactic acid bacteria, a residue of culture product of the lactic acid bacteria and treatment products thereof (concentrate, pasted product, dried product, liquid material, dilution, sterilized material, etc.). There is further provided a feed composition comprising the feed auxiliary.

(57) 要約: *Lactobacillus gasseri*に属する乳酸菌、該乳酸菌破砕物、該乳酸菌培養物、該乳酸菌培養物残渣、その処理物(濃縮物、ペースト化物、乾燥物、液状物、希釈物、殺菌物等)の少なくともひとつを含有する飼料補助剤および該飼料補助剤を含有する飼料組成物。



LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

### 飼料組成物

#### 技術分野

本発明は、飼料組成物に関するものであり、更に詳細には、ラクトバチルス・ガッセリ (*Lactobacillus gasseri*: 以下、*L.gasseri* ということもある) 由来の飼料補助剤を加えた飼料組成物に関するものである。本発明に係る飼料補助剤は、腸内菌叢改善作用、下痢防止作用、抗酸化作用、体重増加作用を有し、抗生物質使用時と同等以上の成長促進効果を奏するものであって、例えば仔ウシ用代用乳の製造に利用することができる。

#### 背景技術

家畜の成長を順調に促進することは、成畜においても容易なことではなく、ましてや体力に劣り且つデリケートな仔畜の場合はなおさらである。例えば新生仔ウシの場合、新生仔ウシの成長阻害因子には、初乳の摂取不足、不適切な環境（不衛生）、飼料の変化、母乳から人工飼料（代用乳、スターターなど）への切り替え、輸送や飼育環境の変化によるストレスなどがある。

健康な動物の腸内では、一定の腸内常在菌が腸粘膜上皮に存在し、各種病原菌の感染を防いでいる。一方、食餌の変化、ストレス、抗生物質の投与などによって腸内菌叢のバランスに乱れが生ずる。下痢の仔ウシでは、*Lactobacillus* もしくは *Bifidobacterium* のどちらかが減少していたという報告があり、これら有用菌が重要なことが指摘されている。

仔ウシの主な疾病は、下痢を主徴とする消化器疾患と肺炎を主徴とする呼吸器疾患である。導入後 2 週間までに下痢が発生し、その後呼吸器疾患が発生する。仔ウシの受動抗体は、2～3 週間で欠乏し、仔ウシ自身が抗体を作り出すように

なるのは、生後4週目以降である。IgG不足による仔ウシの感染症には、大腸菌、ロタウイルス、コロナウイルス、クリプトスポリジア、サルモネラ菌などの下痢症がある。肺炎が多発する仔ウシ群では、出生後の下痢や栄養不足があり、リンパ球の成熟に重要な出生後1ヶ月におけるT細胞の機能低下が認められたという報告がある。

仔ウシは、疾病率が非常に高く、へい死率も5%を越える事例も多く、経営上の圧迫要因となっている。

そこで、当業界では抗生物質が使用されるようになり、例えば、日本では、仔ウシについては、抗生物質（硫酸コリスチン、亜鉛バシトラシン）の使用が許可されている。しかしながら、社会的には、抗生物質を使用しないようにすることが、耐性菌の出現を防止する点からも望まれている。しかし、実際には、仔ウシの成長を促すために抗生物質が多用されている。日本でも、法的に、抗生物質が禁止される方向にある。そこで、当業界においては、抗生物質に代わる安全・安心な飼料添加用組成物が望まれている。

現時点において、抗生物質以外の仔ウシ用成長促進剤としては、例えば次のものが市販されているが、現在許可されている抗生物質の効果を越えるものは、見出されていない。

(1) 生菌剤 (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Clostridium butyricum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Lactobacillus acidophilus*)

(2) オリゴ糖

(3)  $\beta$ -カロチン

(4) ビタミンC

(5) ハーブ (オレガノ) エキス

(6) 酵母細胞壁成分 (グルコマンナン)、酵母細胞膜成分 ( $\beta$ -グルカン)

生菌剤についてみると、*Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703 の培養物残渣を、抗生物質の併用で仔ウシに投与することが提案されており、増体効果の検討が行われているが、この提案は、抗生物質の併用を前提とするものであって、上記ビフィズス菌のみを単用するものではない（例えば、特開昭 6 2 - 1 0 4 5 5 2 号公報参照）。

また、*Lactobacillus acidophilus* に関しては、*L. acidophilus* を仔ウシに投与した報告はあるが、満足すべきものは見られない。しかも、*L. acidophilus* は、単菌ではなく、他の菌種を併用したものが、一般的に生菌剤として市販されている。1980年に、*L. acidophilus* は、菌体の保有する染色体DNAの相同性と細胞壁成分の糖質組成分析により、6サブグループ（*L. acidophilus*、*L. crispatus*、*L. amylovorus*、*L. gallinarum*、*L. gasseri*、*L. johnsonii*）に再分類されることが提唱された。したがって、この同定方法で分類していない *L. acidophilus* は、6サブグループのどれに相当するかは判らないので、菌種を特定することはできない。

一方、*Lactobacillus gasseri* に属する乳酸菌、該乳酸菌含有物に、胃潰瘍の起因であって胃癌との関連も指摘されている *Helicobacter pylori*（ピロリ菌、以下、*H. pylori* ということもある）に対する抑制作用が発見されている（例えば、日本特許第 3 0 4 6 3 0 3 号公報参照）。しかしながら、*L. gasseri* 菌体、その培養物、それから菌体を含む固形物を分離除去した培養物残渣等に、仔ウシをはじめとする仔畜に対する腸内菌叢改善作用、下痢防止作用、抗酸化作用、増体作用があることは全く知られていない。

#### 発明の開示

本発明は、このような技術の現状において、抗生物質を使用することなく、しかも抗生物質と同等又はそれ以上の効果を有する飼料添加物を新たに開発する目

的でなされたものである。

本発明者らは、上記目的を達成するために、各方面から抗生物質代替物について広範に検討した結果、生菌剤に着目し、各種微生物のスクリーニングを行った。

そして本発明者らは、ラクトバチルス・ガッセリに着目し、鋭意研究を重ねた結果、*L.gasseri*を培養し、その培養物もしくは培養物の遠沈上澄液（培養物残渣）を仔畜に投与することにより、仔畜の腸内菌叢を改善し、下痢防止、酸化防止、体重増加などの点で抗生物質投与以上の優れた効果が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

具体的には本発明は以下の（１）から（２６）に関する。

（１） *Lactobacillus gasseri*に属する乳酸菌、該乳酸菌破砕物、該乳酸菌培養物、該乳酸菌培養物残渣、およびそれらの処理物から選ばれる少なくともひとつを含有する飼料補助剤。

（２） 該乳酸菌培養物が、ホエー蛋白質誘導体含有培地に乳酸菌を接種して中和培養した培養物であること、を特徴とする（１）に記載の飼料補助剤。

（３） ホエー蛋白質誘導体が、ホエー蛋白質濃縮物（WPC）、ホエー蛋白質分離物（WPI）、およびこれらの加水分解物から選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする（２）に記載の飼料補助剤。

（４） 該処理物が、濃縮物、ペースト化物、乾燥物、液状物、希釈物、および殺菌物から選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする（１）～（３）のいずれか１項に記載の飼料補助剤。

（５） 乾燥物が噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、およびドラム乾燥物から選ばれる少なくともひとつの乾燥物である（４）に記載の飼料補助剤。

（６） 賦形剤を含有する（１）に記載の飼料補助剤。

(7) 賦形剤がデンプン、デキストリン、乳成分、および珪酸から選ばれる少なくともひとつであることを特徴とする (6) 記載の飼料補助剤。

(8) 乳酸菌が *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (FERM BP-6999) であること、を特徴とする(1)~(7)のいずれか1項に記載の飼料補助剤。

(9) (1)~(8)のいずれか1項に記載の飼料補助剤と飼料を含有する飼料組成物。

(10) 飼料が代用乳、人工乳、およびスターターであること、を特徴とする(9)に記載の飼料組成物。

(11) (1) に記載の飼料補助剤の有効量を家畜に投与することを含む、腸内菌叢を改善する方法。

(12) (1) に記載の飼料補助剤の有効量を家畜に投与することを含む、下痢を防止する方法。

(13) (1) に記載の飼料補助剤の有効量を家畜に投与することを含む、抗酸化力を増強する方法。

(14) (1) に記載の飼料補助剤の有効量を家畜に投与することを含む、体重を増加させる方法。

(15) 家畜の腸内菌叢を改善するための (1) ~ (8) のいずれか1項に記載の飼料補助剤の使用。

(16) 家畜の下痢を防止するための (1) ~ (8) のいずれか1項に記載の飼料補助剤の使用。

(17) 家畜の抗酸化力を増強するための (1) ~ (8) のいずれか1項に記載の飼料補助剤の使用。

(18) 家畜の体重を増加させるための (1) ~ (8) のいずれか1項に記載の飼料補助剤の使用。

(19) 家畜の腸内菌叢を改善を目的とした飼料組成物の製造のための(1)～(8)のいずれか1項に記載の飼料補助剤の使用。

(20) 家畜の下痢防止を目的とした飼料組成物の製造のための(1)～(8)のいずれか1項に記載の飼料補助剤の使用。

(21) 家畜の抗酸化力増強を目的とした飼料組成物の製造のための(1)～(8)のいずれか1項に記載の飼料補助剤の使用。

(22) 家畜の体重増加を目的とした飼料組成物の製造のための(1)～(8)のいずれか1項に記載の飼料補助剤の使用。

(23) 家畜が生後から離乳期までの仔畜であること、を特徴とする(11)～(14)のいずれか1項に記載の方法。

(24) 家畜が生後から離乳期までの仔畜であること、を特徴とする(15)～(22)のいずれか1項に記載の使用。

(25) 仔畜が仔ウシであること、を特徴とする(23)に記載の方法。

(26) 仔畜が仔ウシであること、を特徴とする(24)に記載の使用。

すなわち、本発明は、*L.gasseri*の培養成分を含有してなる飼料補助剤に関するものであり、*L.gasseri*の培養成分としては、*L.gasseri*を培養して得た培養物(菌体、培地成分、代謝分泌物等を含む培養物全体)、それから分離した菌体、菌体破砕物、該培養物から菌体を含む固形物を除去した培養物残渣(培養液、培養液の混濁した部分ではなく澄んだ部分である培養上澄液を包含する)、その処理物〔濃縮物、ペースト化物、乾燥物(噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物の少なくともひとつ)、液状物、希釈物、殺菌物〕から選ばれる少なくともひとつが挙げられる。本発明において飼料組成物とは、*L.gasseri*の培養成分を含有してなる飼料補助剤および飼料を含有する。

*L.gasseri*の培養は、乳酸菌や細菌類の培養にしたがい常法を利用して行えば



よいが、*L.gasseri*の培養には、遠心分離法によって菌体が分離し易い合成培地あるいは半合成培地を用いるのがよい。培養方法は、pHを一定範囲に保持して所定の高濃度菌数に達するまでの中和培養を行うのが好ましい。この高濃度培養法では、菌体および代謝産物の多い培養物が得られる。

培地としては、合成培地、半合成培地その他常用される培地が適宜使用可能であるが、好適な *L.gasseri* の高濃度培養液は、ホエイ蛋白質誘導体及び／又は乳糖を含有する培地、特にホエイ蛋白質誘導体及び／又は乳糖を主成分とする培地を使用する。

通常の培養法では、培地に *L.gasseri* を接種し、35～42℃で12～24時間培養すると、菌数はほぼ最高値に達するが、その数は $10^9$  cfu/ml以下である。また、代謝成分である有機酸の生成量も培養液に対して1.5重量%以下である。

これに対し、中和培養法では、*L.gasseri* の増殖が自らの生成する有機酸で抑制されるのを防ぐために、有機酸の生成量に合わせてアルカリ液を加え、培養液のpHは、目的とする生成物により異なるが、4.5～7.0、好ましくは5.0～6.5の範囲を維持して培養する。この方法により、温度、培養時間は状況により異なるが、30℃～45℃、好ましくは35～40℃で24～60時間、好ましくは24～48時間培養する。中和培養法により、菌数を $10^8 \sim 10^{11}$  cfu/ml、好ましくは $10^9 \sim 10^{11}$  cfu/ml、さらに好ましくは $10^{10} \sim 10^{11}$  cfu/mlに増やすことが可能であり、 $10^9$  cfu/ml以上に増やすことができる。また、代謝成分である有機酸の生成量も培養液に対して3重量%以上となる。

*L.gasseri* を培養して得た培養物（培養液）は、菌体成分および代謝成分（有機酸、ペプチド、オリゴ糖など）による生理作用を有し、また、*L.gasseri* は、抗菌性を有する乳酸やバクテリオシンを産生するだけでなく、免疫賦活能を有す

るオリゴDNAも産生し、これらの産生物質や生理作用が有機的に働いて、仔畜の下痢防止その他の効果を奏するものと、本発明の発明者らは現時点で考えている。これらの効果を得るために、中和培養（高濃度培養）することが望ましい。

培養後、好ましくは中和培養して高濃度のものを得た後、好ましくは菌体分離を行う。菌体分離の方法としては好ましくは遠心分離が挙げられる。菌体の全部または好ましくは菌体の一部や代謝成分を大量に含む培養上清を得る。培養上清は殺菌して用いることが多く、殺菌の条件としては、殺菌される限りは限定されず、温度と時間を組み合わせて殺菌を達成できるよう適宜設定する。好ましくは、50～200℃、0.1秒～1時間の範囲が挙げられる。

ホエイ蛋白質誘導体としては、ホエイ蛋白質濃縮物（W h e y P r o t e i n C o n c e n t r a t e、W P C）、ホエイ蛋白質分離物（W h e y P r o t e i n I s o l a t e、W P I）、これらの加水分解物から選ばれる少なくともひとつが使用され、市販品も適宜使用可能である。

W P Cは、チーズやカゼインを製造する際に生じるホエイを限外濾過・ゲル濾過・乳糖結晶分離などの方法で処理し、蛋白質含量を通常35～85重量%（固形分換算）まで高めたものである。W P Iは、W P Cと区別されるものであって、イオン交換法などの方法で蛋白質含量を95重量%（固形分換算）程度まで高めたものである。

加水分解物としては、W P C、W P I、ホエイ、ホエイ蛋白質から選ばれる少なくともひとつを、ペプシン、トリプシン、パパイン等の蛋白質分解酵素等の酵素で処理した酵素処理物が使用される。

本飼料補助剤は、液状～ペースト状～固体状のいずれの状態にもすることができるが、好ましくは固体状で用いる。また、賦形剤と混合して利用可能であり、賦形剤としては、デンプン、デキストリン、蛋白質、乳糖などの乳成分、珪酸などが用いられる。

本発明の飼料補助剤は、飼料に添加して飼料組成物として家畜に投与することもでき、また、それ自体単独で家畜に投与したり、飼料とは別に飲料水に添加して投与することも可能である。飼料としては、好ましくは、代用乳、スターター、人工乳が挙げられる。（「Dairy Japan」、(株) デーリィ・ジャパン社、2000年、1月号、p.33～37、「牧草と園芸」、雪印種苗(株)、2001年、第49巻第2号、p.9～11、「生産獣医療システム 乳牛編1」、(社) 農産漁村文化協会発行、1999年、p.10～28）。

仔畜1頭当たりの1日の投与量は、仔ウシの場合、固形分換算で0.1～10g、好適には0.5～5gが適量であるが、この範囲は一応の目安であって、仔畜の種類や大きさ、症状等に応じて上記仔ウシの場合に準じて適宜決定することが可能であり、場合によっては上記範囲を逸脱しても構わない。本発明の飼料補助剤の投与期間は特に限定されないが、仔畜に投与する場合、生後から離乳期までを含める方が良く、出生直後から家畜自身が十分に抗体を作り出すようになる期間（6週齢頃）までを含めることが特に好ましい。仔ウシ以外の動物でも、同じ投与量、投与方法で良い。

本発明の対象は哺乳類（好ましくはヒト以外の哺乳類）および鳥類、好ましくは、牛、馬、山羊、羊、豚、水牛、ラクダおよび鶏等の家畜（家禽を含む）であり、さらに好ましくは家畜（哺乳類）、もっとも好ましくは仔畜である。本発明において仔畜とは、生後から離乳期までの仔畜を指すが、離乳期を過ぎたものあるいは成畜に投与しても何らさしつかえはない。

本飼料補助剤を家畜、特に仔畜に摂取させることにより、抗生物質を用いずに、腸内菌叢を改善し、また下痢防止、酸化防止、体重増加などの効果を得ることができる。

本発明においては *L.gasseri* に属する微生物であればすべての乳酸菌が使用可能であるが、好適菌のひとつとして、*Lactobacillus gasseri* OLL 2716 株が例示

される。

*L.gasseri* OLL 2716 株は、ピロリ菌の除菌／感染防御作用を有し、日本特許第 3 0 4 6 3 0 3 3 号において選択された菌株であって、その選定基準は次のとおりである。すなわち、ヒト腸内由来の数多くの乳酸桿菌のうち、①胃酸耐性が高い、②低 pH 条件下での生育が良好である、③ *H.pylori* のヒト胃癌細胞 MK N 4 5 付着抑制能が高い、④ *H.pylori* と混合培養した際に *H.pylori* 増殖阻害能が高い、⑤ *H.pylori* 感染モデルマウスに投与した際に *H.pylori* の除菌能が高い、⑥食品に適用した際に生残性が高く、香味、物性も優れている菌株の選定につき鋭意研究を重ねた結果、これらの条件に合致する菌株として *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 株（本菌は、旧住所〒305-8566 日本国茨城県つくば市東 1-1-3 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 現住所〒305-8566 日本国茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに FERM BP-6999 として 2000 年 1 月 14 日付にて国際寄託されている）が見出されたものである。

*L.gasseri* OLL 2716 (FERM BP-6999) の菌学的性質は次のとおりである。

A. 形態的性状

細胞形態：桿菌

運動性：なし

胞子の有無：なし

グラム染色性：陽性

B. 生理学的性状（陽性：＋、陰性：－、弱陽性：W）

カタラーゼ —

ガス産生 —

15℃での生育 —

グルコン酸資化性 —

乳酸旋光性	D L
-------	-----

好気性発育	+
-------	---

C. 炭水化物発酵性（陽性：＋、陰性：－、弱陽性：W）

アラビノース	－
--------	---

キシロース	－
-------	---

ラムノース	－
-------	---

リボース	－
------	---

グルコース	＋
-------	---

マンノース	＋
-------	---

フルクトース	＋
--------	---

ガラクトース	＋
--------	---

シュクロース	＋
--------	---

セロビオース	＋
--------	---

ラクトース	＋
-------	---

トレハロース	＋
--------	---

メリビオース	－
--------	---

ラフィノース	－
--------	---

メリチトース	－
--------	---

スターチ	W
------	---

マンニトール	－
--------	---

ソルビトール	－
--------	---

デキストリン	W
--------	---

図面の簡単な説明

図1は、各区における下痢発生率（％）を示す。

図 2 は、抗生物質投与区における有用菌（*Bifidobacterium* 属菌及び *Lactobacillus* 属菌）の各試験時期における変化を示す。

図 3 は、同じく L G 区、すなわち *L.gasseri* OLL 2716（FERM BP-6999）投与区における同変化を示す。

図 4 は、抗生物質区及び L G 区における糞便中のアンモニア量の変化を示す。

図 5 は、抗生物質区及び L G 区における血清中の S O D 活性の推移を示す。

図 6 は、抗生物質区及び L G 区における増体量を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を挙げ本発明をさらに詳述するが、これらは本発明を限定するものではない。

試験に供した代用乳の組成及び供試代用乳の投与スケジュールは次のとおりとした。なお、濃縮ホエー蛋白としては市販の W P C を使用し、*L.gasseri* 培養物残渣としては、*L.gasseri* OLL 2716（FERM BP-6999）を培養して得た培養物全体（150 億個／m l の菌体含有）を遠心分離して得た液体部（上澄液）について、これを殺菌処理したものを使用した。

#### 試験に供した代用乳の組成：

脱脂粉乳	50 %
濃縮ホエー蛋白	14 %
混合油脂	22.5 %
<u>プレミックス（ビタミン、ミネラル類）</u>	<u>13.5 %</u>
合計	100 %

上記をベースミルクとし、

#### *L.gasseri* 区（L G 区）：

ベースミルク + *L.gasseri* 培養物残渣 5 % を供与した。

但し、*L.gasseri* 培養物残渣は、65℃、30分の殺菌をして使用した。

抗生物質区：

ベースミルク＋抗生物質

但し、抗生物質としては、亜鉛バシトラシン420万単位／tonおよび硫酸コリスチン20g力価／tonを供与した。

#### 供試代用乳の投与スケジュール：

契約農家で出生した和牛（黒毛和種）に、出生後速やかに十分な初乳を授乳し、出生2週間後に、当社試験牧場に導入し、LG区と抗生物質区に分け、上記供試代用乳250gを1.8Lの温水（45℃）に溶かし、朝、夕の2回を投与した。

試験時期：

- （1）：導入時（出生後、初乳、生乳を与えて2週間目）
- （2）：2週間目（導入後試験用代用乳を与えて2週間目）
- （3）：4週間目（導入後試験用代用乳を与えて4週間目）
- （4）：離乳後1週間目（導入後試験用代用乳を与えて8週間目に離乳、その後1週間目）

#### 実施例1

（下痢発生低減試験）

下記の投与試料区において、下痢発生率（導入後2週間以内に下痢を発生した率）をチェックし、得られた結果を下記表1及び図1に示した。なお、表1においてカッコ内の数字は、試験に供した仔ウシ全頭数に対する下痢を発生した仔ウシの頭数である。

(投与試料区)

対照区 (ベースミルク)

L G 区

抗生物質区

(表 1)

下痢発生率の結果

対照区 (ベースミルク)	85% (11 / 13)
L G 区	54% (7 / 13) *
抗生物質区	75% (9 / 12)

\*有意差あり (p<0.05)

上記結果から明らかなように、L G の投与は、抗生物質の投与以上に、下痢の発生を低減し、下痢の程度も軽減された。

## 実施例 2

(菌そう改善、腐敗産物生成抑制及び増体試験)

仔ウシをそれぞれ下記の試験区に分け、菌そう改善試験、腐敗産物生成抑制試験、及び増体試験をそれぞれ行った。なお、試験時期は前記した試験時期 (1)、(2)、(3)、(4) とした。得られた結果を下記にそれぞれ示すが、いずれも平均値を示す。

(投与試験)

L G 区 (10 頭)

抗生物質区 (12 頭)

(I) 腸内菌そう改善試験

抗生物質区、L G 区の仔ウシについて、各試験期における腸内菌そうの変化を調査した。調査対象菌は、次のとおり (A) ~ (E) とし、糞便 1 g 中の菌数を



計測した。

(調査対象菌)

- (A) *Bifidobacterium* 菌
- (B) *Lactobacillus* 菌
- (C) *Enterobacteriaceae* 菌
- (D) *Clostridium*, *Lecithinase*(+)菌
- (E) *Clostridium*, *Lecithinase*(-)菌

得られた結果を、抗生物質区については、表 2 及び図 2 に示し、LG 区については、表 3 及び図 3 に示した。各表のデータは、糞便 1 g 中の菌数を対数で表示したものであり、但しクロストリジウム属菌 (D、E) は検出率 (%) で表示した。なお、図 2、3 においては、ビフィドバクテリウム属菌 (A) 及びラクトバチルス属菌 (B) のデータを図示した。

(表 2)

抗生物質区における腸内菌そうの変化

試験時期	(1)	(2)	(3)	(4)
(A)	8.92	9.02	9.01	8.69
(B)	8.30	7.69	7.16	7.11
(C)	8.84	8.91	8.23	7.95
(D)	83%	65%	58%*	67%
(E)	75%	17%	33%	50%

\*有意差あり (p<0.05)

(表 3)

L G 区における腸内菌そうの変化

試験時期	(1)	(2)	(3)	(4)
(A)	9.34	9.41	9.38	8.63
(B)	7.61	8.41	8.64*	6.85
(C)	9.09	8.55	8.06*	7.79
(D)	90%	60%	50%*	60%
(E)	80%	20%	40%	90%

\*有意差あり (p &lt; 0.05)

上記結果から明らかなように、導入期では、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus* の少ない仔ウシが見られ、個体間のバラツキが大きい。L G を 2 週間投与すると、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus* が増え、個体間のバラツキが小さくなり、この期間は下痢が発生し易いので、有用菌の増加は有益である。有用菌を増加させる効果は、L G の方が抗生物質より優れていた。特に、仔ウシに有益である *Lactobacillus* の菌数が抗生物質の投与で減少したのに対し、L G 投与で増加したことは非常に意義がある。

## (II) 腐敗産物生成抑制試験

抗生物質区、L G 区の仔ウシについて、各試験期における糞便中の腐敗産物 (アンモニア) 量をそれぞれ測定した。得られた結果を下記表 4 及び図 4 に示す。なお、アンモニア量は  $\mu\text{g}$  / 糞便 1 g で表示した。

(表 4)

腐敗産物（アンモニア）の変化（ $\mu\text{g}$ ／糞便 1 g）

試験時期	(1)	(2)	(3)	(4)
抗生物質区	1090	753	607*	462
L G 区	1000	434	603*	483

\*有意差あり (p&lt;0.05)

上記結果から明らかなように、導入後 L G を 2 週間投与すると、糞便中のアンモニア量は減少した。この時期の腐敗産物の減少は有益である。腐敗細菌 *Clostridium* の減少結果と、よく符合している。

## (III) 抗酸化試験

抗生物質区、L G 区の仔ウシについて、導入時、投与 2 週間目および 4 週間目に抗酸化作用のある血清中のスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性を測定した。得られた結果を下記表 5 及び図 5 に示す。

(表 5)

血清中の SOD 活性の比較

導入時の SOD 値 (Unit/ml) を 100 として算出した相対値で示す。

	導入時	2 週間目	4 週間目
抗生物質区	100	88	105
L G 区	100	101	115*

\*有意差あり (p&lt;0.05)

血清中の SOD 活性は、L G 投与の方が抗生物質投与より高く維持されていた。仔ウシでは、輸送や環境によるストレスなどにより生体に悪影響を及ぼす活性酸素が生成しやすい。仔ウシの血清中の SOD 活性は、導入後数週間は低下する傾向にあり、この時期に血清中の SOD 活性を高めることは、活性酸素の影響を排

除するのに有効である。

#### (IV) 増体試験

抗生物質区、L G 区の仔ウシについて、導入後から 4 週間目までの 1 日当たりの増体量をそれぞれ測定した。得られた結果を下記表 6 及び図 6 に示す。なお、増体量は 1 日当たりの K g で表示した。

(表 6)

増体量 (導入後から 4 週目までの 1 日当たりの増体量 : K g)

抗生物質区	0.35
L G 区	0.43

上記結果から明らかなように、増体量は、L G 投与の方が抗生物質投与より 2 3 % すぐれていた。

本発明によれば、例えば、上記実施例から明らかなように、*L.gasseri* OLL 2716 の培養物残渣 (殺菌したもの) を、生後から離乳期までの仔ウシに投与すると、抗生物質 (硫酸コリスチン、亜鉛バシトラシン) 投与の時に比べて、腸内菌そうの改善効果も優れ、下痢防止、酸化防止および体重増加の効果も著しく良くなる。

本発明を詳細にまた特定の実施態様を参照して説明したが、本発明の精神と範囲を逸脱すること無く様々な変更や修正を加えることができることは当業者にとって明らかである。

本出願は、2003 年 4 月 8 日出願の日本特許出願 (特願 2003-104551) に基づくものであり、その内容はここに参照として取り込まれる。ここに引用されるすべての参照は全体として取り込まれる。

### 産業上の利用可能性

本発明に係るラクトバチルス・ガッセリ由来の飼料組成物を仔ウシ等の仔畜に投与することにより、仔畜の腸内菌叢を改善し、しかも積極的に、下痢の発生を低減、抑制し、アンモニア等の腐敗産物の生成を低減、抑制し、更に活性酸素の影響を低減し、体重増加をひき起こすという著効が奏される。

仔畜は、各種の疾病にかかり易く、特に下痢を主徴とする消化器疾患と肺炎を主徴とする呼吸器疾患にかかり易いものであって、一旦これらの疾病にかかると、発育が遅れて生産性が大幅に低下して酪農家に大きな被害、損失をもたらすものであるが、本発明によってその原因のひとつが除去ないし大幅に抑制され、本発明は酪農業界に多大な貢献をなすものである。

## 請求の範囲

1. *Lactobacillus gasseri*に属する乳酸菌、該乳酸菌破砕物、該乳酸菌培養物、該乳酸菌培養物残渣、およびそれらの処理物から選ばれる少なくともひとつを含有する飼料補助剤。
2. 該乳酸菌培養物が、ホエー蛋白質誘導体含有培地に乳酸菌を接種して中和培養した培養物であること、を特徴とする請求の範囲 1 に記載の飼料補助剤。
3. ホエー蛋白質誘導体が、ホエー蛋白質濃縮物 (W P C)、ホエー蛋白質分離物 (W P I)、およびこれらの加水分解物から選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする請求の範囲 2 に記載の飼料補助剤。
4. 該処理物が、濃縮物、ペースト化物、乾燥物、液状物、希釈物、および殺菌物から選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする請求の範囲 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の飼料補助剤。
5. 乾燥物が噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、およびドラム乾燥物から選ばれる少なくともひとつである請求の範囲 4 に記載の飼料補助剤。
6. 賦形剤を含有する請求の範囲 1 記載の飼料補助剤。
7. 賦形剤がデンプン、デキストリン、乳成分、および珪酸から選ばれる少なくともひとつであることを特徴とする請求の範囲 6 記載の飼料補助剤。
8. 乳酸菌が *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (FERM BP-6999) であること、を特徴とする請求の範囲 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の飼料補助剤。

9. 請求の範囲 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の飼料補助剤と飼料を含む飼料組成物。

10. 飼料が代用乳、人口乳、およびスターターから選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする請求の範囲 9 に記載の飼料組成物。

11. 請求の範囲 1 に記載の飼料補助剤の有効量を家畜に投与することを含む、腸内菌叢を改善する方法。

12. 請求の範囲 1 に記載の飼料補助剤の有効量を家畜に投与することを含む、下痢を防止する方法。

13. 請求の範囲 1 に記載の飼料補助剤の有効量を家畜に投与することを含む、抗酸化力を増強する方法。

14. 請求の範囲 1 に記載の飼料補助剤の有効量を家畜に投与することを含む、体重を増加させる方法。

15. 家畜の腸内菌叢を改善するための請求の範囲 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の飼料補助剤の使用。

16. 家畜の下痢を防止するための請求の範囲 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の飼料補助剤の使用。

17. 家畜の抗酸化力を増強するための請求の範囲 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の飼料補助剤の使用。

18. 家畜の体重を増加させるための請求の範囲 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の飼料補助剤の使用。

19. 家畜の腸内菌叢を改善を目的とした飼料組成物の製造のための請求の範囲1～8のいずれか1項に記載の飼料補助剤の使用。

20. 家畜の下痢防止を目的とした飼料組成物の製造のための請求の範囲1～8のいずれか1項に記載の飼料補助剤の使用。

21. 家畜の抗酸化力増強を目的とした飼料組成物の製造のための請求の範囲1～8のいずれか1項に記載の飼料補助剤の使用。

22. 家畜の体重増加を目的とした飼料組成物の製造のための請求の範囲1～8のいずれか1項に記載の飼料補助剤の使用。

23. 家畜が生後から離乳期までの仔畜であること、を特徴とする請求の範囲11～14のいずれか1項に記載の方法。

24. 家畜が生後から離乳期までの仔畜であること、を特徴とする請求の範囲15～22のいずれか1項に記載の使用。

25. 仔畜が仔ウシであること、を特徴とする請求の範囲23に記載の方法。

26. 仔畜が仔ウシであること、を特徴とする請求の範囲24に記載の使用。



図 1

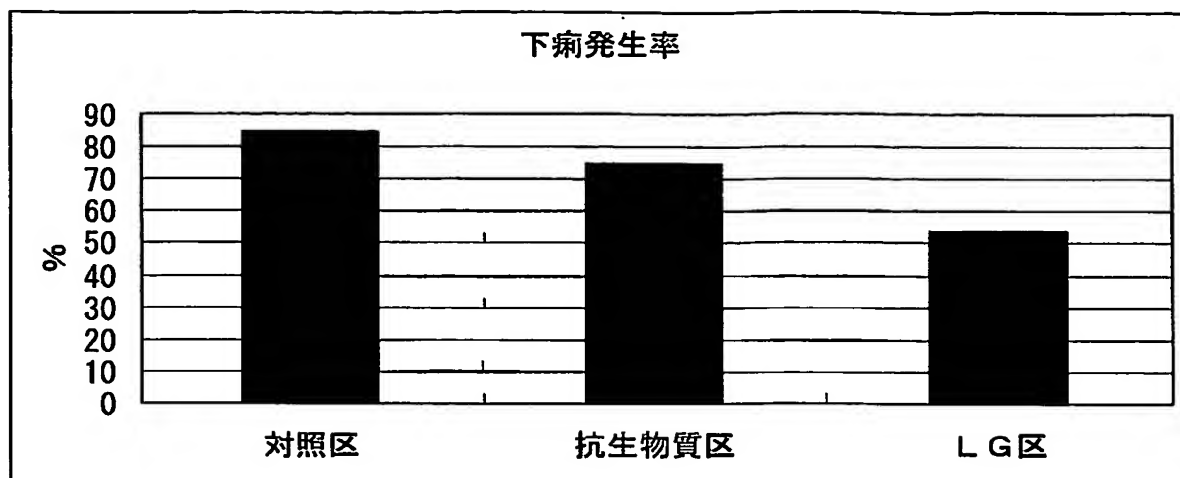


図 2

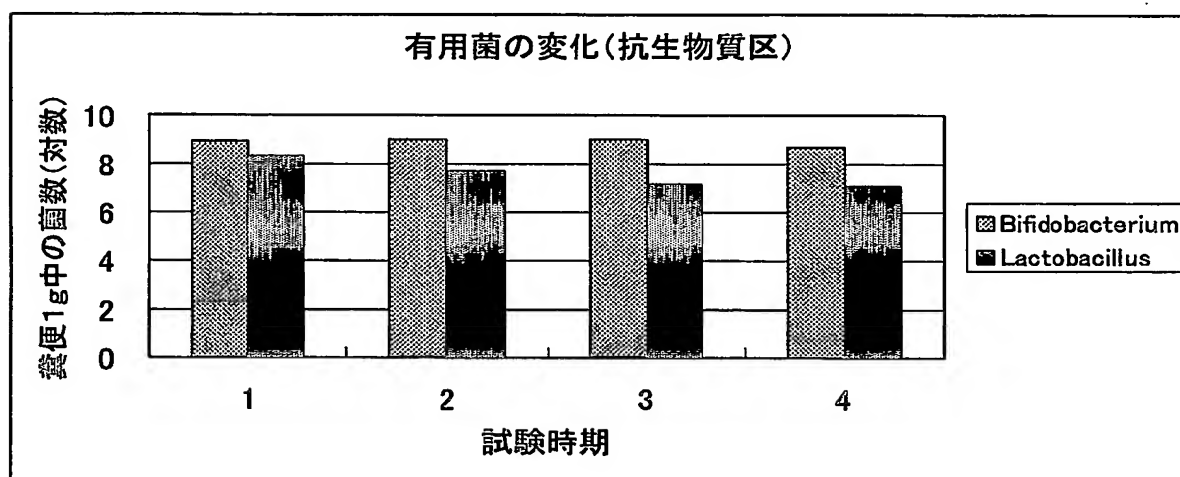


図 3

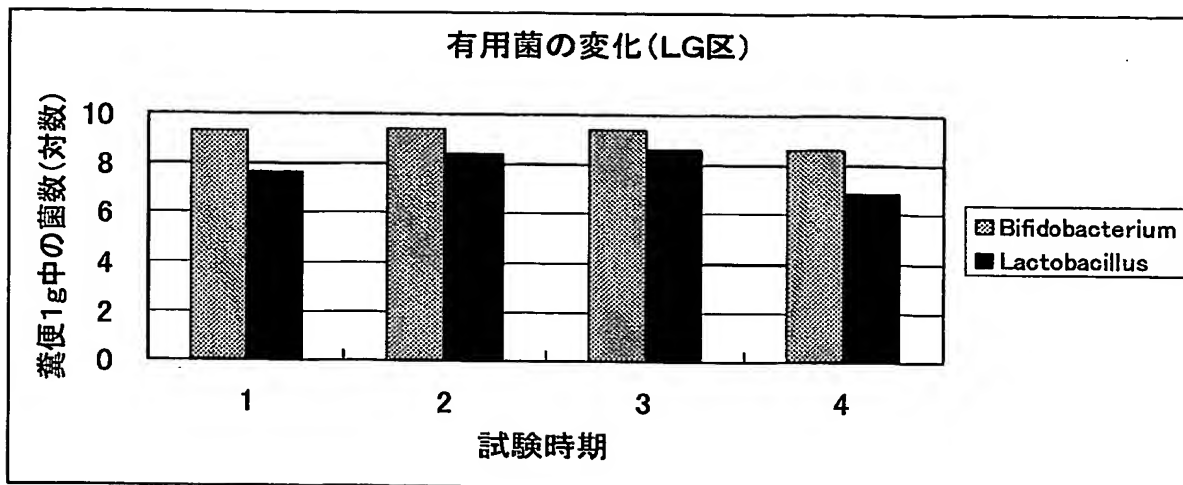


図 4

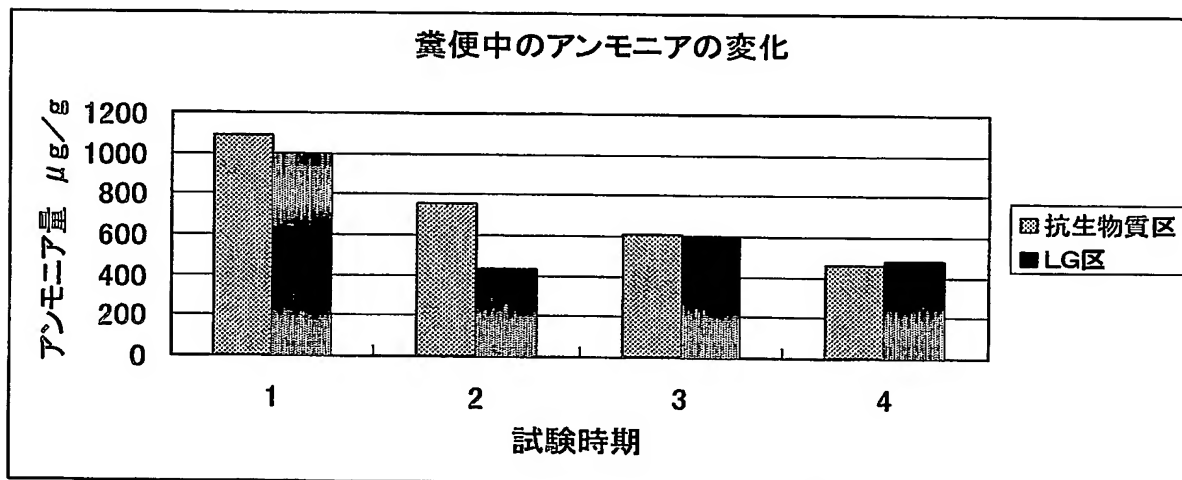


図 5

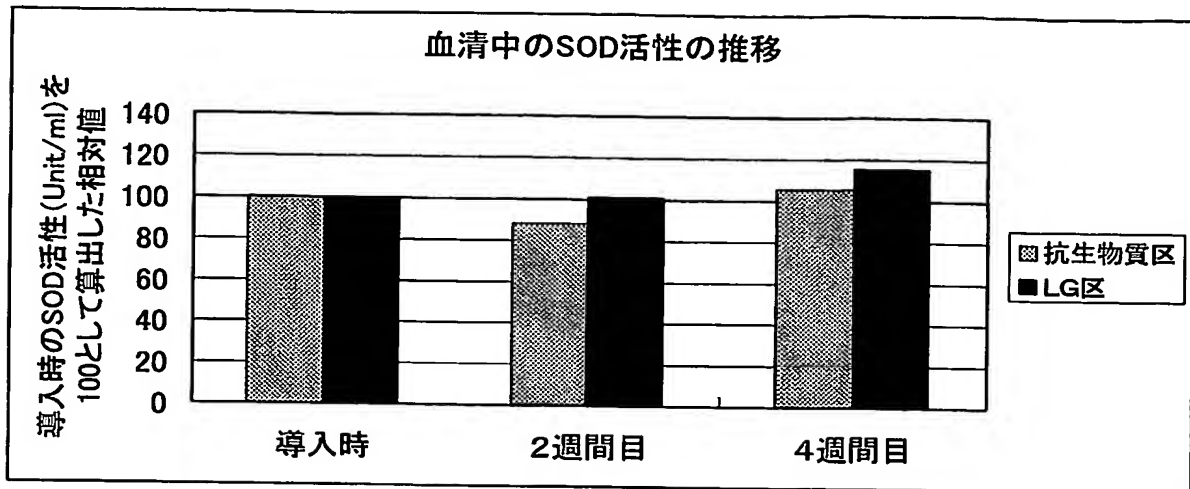
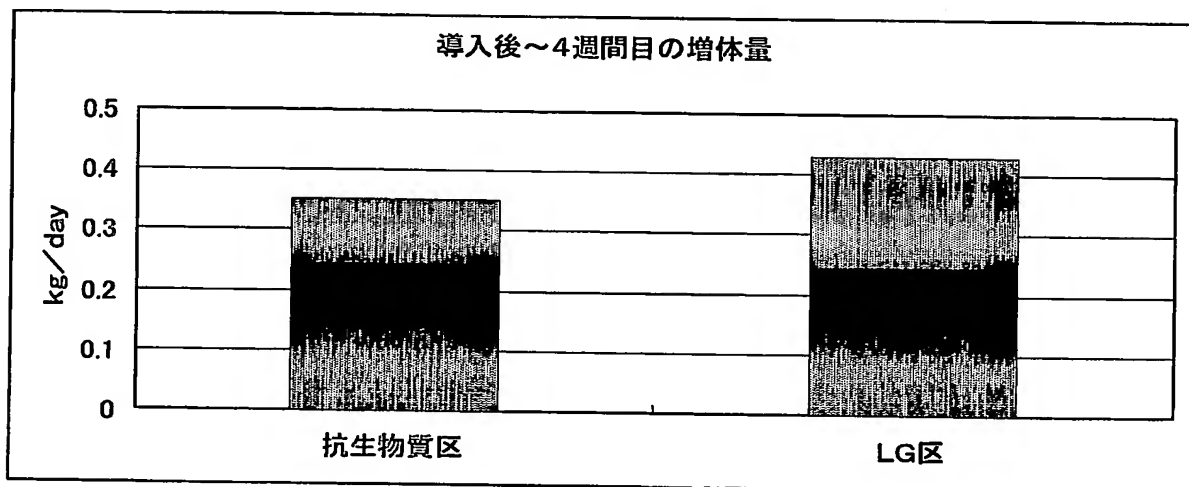


図 6



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005089

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A23K1/16, A23K1/18, A23K1/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A23K1/16, A23K1/18, A23K1/08, A61K35/74, A23L1/28, A23C9/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JOIS (JSTPlus), STN (BIOSIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 01-098446 A (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 17 April, 1989 (17.04.89), Full text (Family: none)	1-12, 14-16, 18-20, 22-26
Y	JP 3046303 B (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 29 May, 2000 (29.05.00), Full text & WO 01/000045 A1 & JP 13-000143 A & EP 1112692 A1 & US 6596530 B & US 2003/0161820 A1	1-12, 14-16, 18-20, 22-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
13 July, 2004 (13.07.04)

Date of mailing of the international search report  
03 August, 2004 (03.08.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005089

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 62-104552 A (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), 15 May, 1987 (15.05.87), Full text & EP 0221520 A2 & US 4985246 A1	10
Y	JP 2000-287626 A (Yakult Honsha Co., Ltd.), 17 October, 2000 (17.10.00), Full text (Family: none)	4-10, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 24-26
E, X	JP 2004-189672 A (Kabushiki Kaisha Ghen Corp.), 08 July, 2004 (08.07.04), Full text (Family: none)	1, 4, 5, 9, 12, 14, 16, 18, 20, 22-26
P, X	JP 2003-253262 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 10 September, 2003 (10.09.03), Full text (Family: none)	1-7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21
A	JP 2001-275658 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 09 October, 2001 (09.10.01), Full text (Family: none)	1-26
Y	JP 2002-335953 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 26 November, 2002 (26.11.02), Full text (Family: none)	11, 15, 19

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> A23K1/16 A23K1/18 A23K1/08

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> A23K1/16 A23K1/18 A23K1/08  
A61K35/74 A23L1/28 A23C9/12

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
日本国公開実用新案公報 1971-2004年  
日本国登録実用新案公報 1994-2004年  
日本国実用新案登録公報 1996-2004年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JOIS (JSTPlus)  
STN (BIOSIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 01-098446 A (明治乳業株式会社) 1989. 04. 17, 全文, ファミリーなし	1-12, 14-16, 18-20, 22-26
Y	JP 3046303 B (明治乳業株式会社) 2000. 05. 29, 全文, & WO 01/000045 A1 & JP 13-000143 A & EP 1112692 A1 & US 6596530 B & US 2003/0161820 A1	1-12, 14-16, 18-20, 22-26

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 07. 2004

国際調査報告の発送日

03. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号特許庁審査官 (権限のある職員)  
松本 隆彦

2 B

2914

電話番号 03-3581-1101 内線 3237

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 62-104552 A (森永乳業株式会社) 1987. 05. 15, 全文, & EP 0221520 A2 & US 4985246 A1	10
Y	JP 2000-287626 A (株式会社ヤクルト本社) 2000. 10. 17, 全文, ファミリーなし	4-10, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 24-26
E, X	JP 2004-189672 A (株式会社ゲン・コーポレーション) 2004. 07. 08, 全文, ファミリーなし	1, 4, 5, 9, 12, 14, 16, 18, 20, 22-26
P, X	JP 2003-253262 A (雪印乳業株式会社) 2003. 09. 10, 全文, ファミリーなし	1-7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21
A	JP 2001-275658 A (雪印乳業株式会社) 2001. 10. 09, 全文, ファミリーなし	1-26
Y	JP 2002-335953 A (雪印乳業株式会社) 2002. 11. 26, 全文, ファミリーなし	11, 15, 19